平成22年8月初版

〔食物アレルギー物質検査キットシリーズ〕

アレルゲンアイ® ELISA　小麦

取扱説明書

本製品をご使用になる前に必ずお読みください。

【特徴】

1. 本製品はマイクロプレートを使用したELISA法による測定キットであり通常の実験室での測定が可能です。
2. 小麦に多く含まれるタンパク質に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いており、食品中に含まれる小麦タンパク質を高感度に測定可能です。
3. 原材料から加工食品まで幅広く適用可能です。

⚠ 注意:加工食品の場合には目的タンパク質の抽出効率の低下や、目的タンパク質の変性などの理由により検出感度が低下することがあります。

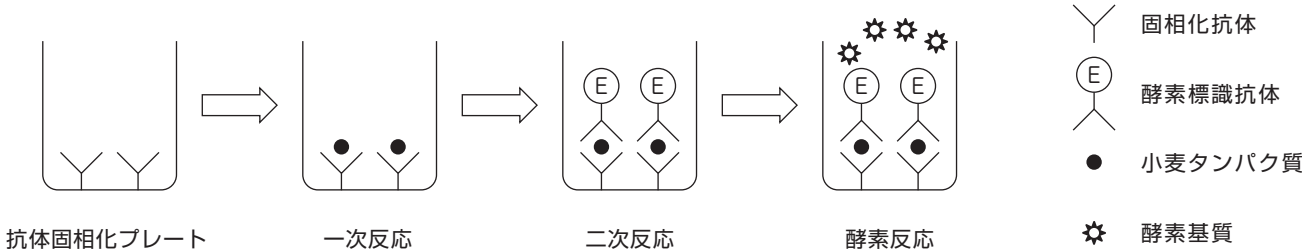
【製品構成】

	品　名	容　量	数量
A	抗体固相化プレート(カバー付)	96ウェル(8ウェル×12列)	1枚
B	標準品(50ng/mL) 医薬用外毒物 (2-メルカプトエタノール0.1%含有)	1mL	2本
C	酵素標識抗体液	13mL	1本
D	発色液 (TMB溶液)	13mL	1本
E	反応停止液 (0.5M 塩酸、0.25M 硫酸)	13mL	1本
F	希釈用緩衝液	100mL	1本
G	洗浄液 (10倍濃縮)	100mL	1本
H	抽出用試薬① (20倍濃縮)	50mL	1本
I	抽出用試薬② (20倍濃縮)	55mL	1本
J	抽出用試薬③ (20倍濃縮) 医薬用外毒物 (2-メルカプトエタノール40%含有)	55mL	1本
K	取扱説明書		1部

【目的・性能】

1. 食品中に含まれる小麦タンパク質の測定
2. 測定溶液中の小麦タンパク質を0.78～50ng/mLの範囲で測定可能
3. 偽陽性、偽陰性については、プリマハム㈱ホームページにて公開している「偽陽性、偽陰性一覧」をご参照ください。

【測定原理】

1. 小麦タンパク質と結合する抗体がプレートのウェル内に固相化されています。
2. 試料中の小麦タンパク質がプレート上の抗体に捕捉され複合体を形成します(一次反応)。
3. 酵素標識抗体がプレート上の複合体に結合します(二次反応)。
4. 発色液を加えると複合体に結合した酵素により呈色します(酵素反応)。
5. 反応停止液で発色を停止し、測定を行います。
6. 得られた吸光度に対応する小麦タンパク質濃度を標準曲線から算出します。

【必要な機器、器具】

1. マイクロピペット(50µL～1000µLの範囲が必要です)、メスシリンダー、ビーカー、50mL遠沈管
2. 粉砕機(フードカッター、ミルミキサーなど)
3. 振とう機
4. 遠心分離機(3,000×g以上が可能なもの)
5. 天秤
6. プレートリーダー(単波長:450nmまたは2波長:主波長450nm、副波長600～650nm)
7. 解析ソフト(4係数Logistic解析が可能なもの)

【測定の際の注意事項】

1. 試薬は室温(20～25℃)に戻し、指定の調製法に従い調製してください。
2. 測定は2重測定以上で行ってください(3重測定を推奨します)。
3. 反応時間は厳守してください。
4. 分注量に注意し、分注器具は定期的に検定してください。
5. 器具を介した汚染を防ぐため使い捨てのチューブ、ピペットおよびフィルター付チップの使用をお勧めします。抽出に用いる器具は検体毎に十分な洗浄を行ってください。
6. 本製品による測定は高感度なため必ずプレートカバーを用い、清潔な環境で測定を行ってください。また、使い捨て手袋、マスクの使用をお勧めします。
7. 各反応後の洗浄が不十分な場合、バックグラウンドが高くなる可能性があります。ウェル内の液をペーパータオルを使用して叩くなどして確実に除き、洗浄後は速やかに次の試薬を分注してください。
8. 酵素反応は遮光下で行ってください。
9. プレートの底はなるべく触れないようにしてください。指紋等で汚れた場合は十分に拭き取り測定してください。
10. 本キットは高濃度の2-メルカプトエタノールを含むため、特有の臭気があります。そのため検体調製、抽出の際はドラフトの使用をお勧めします。また、実験中は使い捨て手袋、マスクの着用をお勧めします。

【試薬の調製】

1. 検体抽出液:
   H:抽出用①液、I:抽出用②液、J:抽出用③液および精製水を1:1:1:17の割合で混合し、よく攪拌した後、使用してください。
   ＊抽出用②液に沈殿が生じている場合は加温溶解してからご使用ください。

〈検体抽出液調製例:24検体分調製する場合〉

H:抽出用①液(20倍濃縮)	: 25mL
I:抽出用②液(20倍濃縮)	: 25mL
J:抽出用③液(20倍濃縮)	: 25mL
精製水	: 425mL
合計	: 500mL

2. F:希釈用緩衝液:
   使用前に室温に戻してそのまま使用してください。
   ※希釈用緩衝液は、アレルゲンアイ ELISAシリーズで「卵(オボアルブミン)」、「牛乳(β-ラクトグロブリン)」、「小麦」、「落花生」は共通で使用できます。「そば」はそばキット専用となりますので、そばキットの希釈用緩衝液はその他のキットに使用しないでください。
3. A:抗体固相化プレート:
   アルミパウチから出さず室温に戻し、その後、必要な列数を取り出してください。開封後はすぐに使用してください。
4. 標準品希釈液: 調製した検体抽出液をF:希釈用緩衝液で20倍に希釈してください。
5. 標準溶液: B:標準品を標準品希釈液で下記の希釈例を参考に希釈してください。

標準溶液濃度(ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
標準品添加量(µL)	800	400	400	400	400	400	400	0
標準品希釈液添加量(µL)	0	400	400	400	400	400	400	400

＊標準溶液の希釈は用時調製して下さい。また、測定毎に標準曲線を作成して下さい。

6. G:洗　　浄　　液: 精製水で10倍に希釈してください。
7. C:酵素標識抗体液: 使用前に室温に戻し、そのまま使用してください。
8. D:発　　色　　液: 使用前に室温に戻し、そのまま使用してください。
9. E:反 応 停 止 液: 使用前に室温に戻し、そのまま使用してください。

【検体の調製法・抽出法】

1. 被検食品(検体)をミキサーなどで粉砕し均質化し調製試料とします。
2. 調製試料1gをポリプロピレン製50mL遠沈管に取り、調製した検体抽出液19mLを加えてよく混合し固形分を均等に分散します。
3. 振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩振とうしながら抽出します(90～110往復ストローク/分、室温、振とう幅3cm程度)。振とうにより、液が遠沈管の両端に打ち付けるように調整します。時々遠沈管の上下を入れ替える等して、液面に沿って付着する検体を分散させます。pHを確認し中性付近(pH6.0～8.0)になるように調整します。
   ＊このとき加えたアルカリ(あるいは酸)の容量を加味し、最終的な小麦タンパク質含有量を算出してください。
4. 抽出試料を3,000×g、室温で20分間遠心分離し、分離された上清を回収、もしくは沈査が得られない場合は上清をろ過し、ろ液を回収します。

5. 回収した上清もしくはろ液をF:希釈用緩衝液で20倍希釈したものを測定溶液とします。(例:希釈用緩衝液950μLに、上清またはろ過液50μLを加えます。)
＊さらに希釈して測定する場合は標準品希釈液を調製し希釈に用いてください。

【測定法】

1. 一次反応
 1) A:抗体固相化プレートをアルミパウチを開封せずに室温に戻し、その後必要列数のみ取り出します。プレート背面の乾燥剤は取り外し、残りのプレートと共にアルミパウチに入れ、パウチ内を乾燥状態に保ってください。
 2) 各ウェルに標準溶液(0, 0.78～50ng/mL)、測定溶液を100μLずつ添加します。
 3) 軽く攪拌した後、プレートカバーをし、室温で正確に1時間静置して反応させます。
2. 二次反応
 1) ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり300～400μLずつの洗浄液で5回洗浄します。
 2) 室温に戻したC:酵素標識抗体液を各ウェルに100μLずつ分注します。
 3) 軽く攪拌した後、プレートカバーをし、室温で正確に30分間静置して反応させます。
3. 酵素反応
 1) ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり300～400μLずつの洗浄液で5回洗浄します。
 2) 室温に戻したD:発色液を各ウェルに100μLずつ分注します。
 3) 軽く攪拌した後、プレートカバーをし、室温遮光下で正確に10分間静置して反応させます。
 4) 室温に戻したE:反応停止液を各ウェルに100μLずつ分注し、軽く攪拌し酵素反応を停止させます。
4. 測定
 1) プレートリーダーを用い主波長450nm、副波長600～650nmの条件で各ウェルの吸光度を測定します。
  ＊酵素反応停止後は30分以内に吸光度を測定してください。
 2) 標準溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中の小麦タンパク質濃度を求めます。

【抽出フローチャート】

□検体抽出液調製
□希釈用緩衝液を室温に戻す
被検食品
↓ □均一な状態に粉砕
調製試料 1g
↓ □調製済み検体抽出液19mL混和、振とう一晩(12時間以上)、室温
↓ □pH6.0～8.0に調整
抽出試料
↓ □3,000×g 室温 遠心分離 20分
遠心上清
↓ □必要に応じろ過
上清もしくはろ液
↓ □希釈用緩衝液で20倍希釈
測定溶液

【測定操作フローチャート】

□プレート洗浄液調製
□検体抽出液調製
□標準品希釈液調製
□標準品希釈(標準溶液:0, 0.78～50ng/mL)
□測定溶液準備
□抗体固相化プレートを室温に戻す
抗体固相化プレート
↓ □必要数準備
一次反応
↓ □標準溶液、測定溶液(100μL/ウェル)
↓ □室温 1時間静置
↓ □洗浄
二次反応
↓ □酵素標識抗体液(100μL/ウェル)
↓ □室温 30分間静置
↓ □洗浄
酵素反応
↓ □発色液(100μL/ウェル)
↓ □室温 10分間静置
反応停止
↓ □反応停止液(100μL/ウェル)
吸光度測定(450nm/600～650nm)
↓
データ解析

【データ解析】

1. 標準溶液を測定し、得られた吸光度から4係数Logistic解析(4-パラメータ解析)を用いて標準曲線グラフを作成します。
2. 作成した標準曲線から、測定溶液中の小麦タンパク質濃度(ng/mL)を読み取ります。
 ＊測定溶液の吸光度が標準曲線の吸光度より高い場合はさらに希釈して再度、測定を行ってください。
 【検体の調製法・抽出法】5参照
3. 読み取った濃度に抽出時の希釈倍率(基本は400倍)を乗じて食品中の小麦タンパク質濃度を算出します。

【使用上の注意事項】

1. 本製品内の試薬は研究目的以外に使用しないでください。
2. 取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
3. 使用期限の過ぎた製品および構成品は使用しないでください。
4. ロットの異なる試薬や本キット以外の試薬を組み合わせて使用しないでください。
5. 測定の際は毎回標準溶液を測定し、必ず標準曲線を作成してください。
6. 試薬が皮膚、粘膜、衣類などに付着しないよう注意し、誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
7. B:標準品、J:抽出用③液に含まれる2-メルカプトエタノールは毒物に指定されていますので、その取扱いは充分ご注意願います。洗浄液を含む廃液等の廃棄につきましては、法に準じてお取扱いください。
8. 本製品による測定結果の評価及び利用はお客様の責任と判断において行ってください。
9. 製品の仕様については予告なく変更になる場合があります。

【製品の保存条件・使用期限】

1. 冷蔵(2～8℃)の光の当らない場所に保管してください。また、凍結は避けてください。
2. 使用期限は製品外箱ラベルに記載してあります。未開封時の使用期限です。
3. 開封した試薬はなるべく早くお使いください。

【廃棄上の注意事項】

1. 本製品、試料、測定溶液等を廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、衛生面、環境面に十分配慮してください。
2. B:標準品、J:抽出用③液に含まれる2-メルカプトエタノールは毒物に指定されていますので、洗浄液を含む廃液等の廃棄につきましては、法に準じてお取扱いください。

【バリデーション結果】

1. 試料
 白がゆ、お汁粉、オレンジジュース、味噌汁、ソーセージ
 試料には小麦一次標準粉末をタンパク濃度が10μg/gとなるように添加した。
2. 参加機関(14機関)
 ・オリエンタル酵母工業株式会社
 ・株式会社第一化成
 ・社団法人日本食品衛生協会
 ・日本生活協同組合連合会
 ・不二製油株式会社
 ・キッコーマン株式会社
 ・財団法人東京顕微鏡院
 ・財団法人日本食品分析センター
 ・財団法人日本冷凍食品検査協会
 ・株式会社マルハニチロホールディングス
 ・三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
 ・株式会社ニッポンジーン
 ・日本水産株式会社
 ・株式会社ファスマック
 (五十音順)
3. 手順
 抽出方法・キット操作方法・報告様式に関する文書、試料(5種類)、キットをそれぞれの参加機関に送付した。
 参加機関は各試料について、2回の抽出・測定を行った。キットの説明書に従い、同一プレート上で8濃度(ブランクを含む)の検量線と、各抽出液を3ウェルで測定し、得られた測定結果をプリマハム株式会社基礎研究所へ返送した。
 プリマハム株式会社基礎研究所では、参加機関から送付されたデータを、AOAC INTERNATIONALあるいはJIS Z8402-2の手順に従い、外れ値を除外するためにCochran検定及びGrubbsの検定(両者とも有意水準2.5%)を行なった後、平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。
4. バリデーション結果
 下の表に示すように、回収率及び室間精度(RSD_R)いずれも、通知(「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成22年9月10日消食表第286号消費者庁次長通知)に示された基準を満たしている。

	計算に含めた機関数	回収率(%)	併行精度 RSD_r(%)	室間精度 RSD_R(%)
白がゆ	13	120.9	5.8	23.8
お汁粉	11	81.6	5.0	16.6
オレンジジュース	14	67.5	4.3	16.4
味噌汁	12	61.7	5.8	9.4
ソーセージ	13	80.9	4.1	19.1

[発売元]
〒300-0841 茨城県土浦市中向原635番地
プリマハム株式会社 基礎研究所
TEL:029-842-4333 FAX:029-842-5216